

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08315

研究課題名(和文) 肺高血圧を伴う慢性肺疾患肺における肺胞傷害・修復機転の検討と治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the pathophysiology and the treatment for pulmonary fibrosis associated with bronchopulmonary dysplasia

研究代表者

大田 千晴(Ota, Chiharu)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00733106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：未熟児慢性肺疾患に伴う肺高血圧症(BPD-PH)の発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。BPD-PH患者肺(移植ドナー肺)を用いて、肺胞上皮細胞マーカー、血管内皮細胞マーカーによる免疫染色を行い、BPD-PH患者肺における分布について検討した。肺血管拡張薬を用いて治療してきたBPD-PH患者の10年間のCT所見を解析し、解析ソフトを用いてVolumetryを行い、その結果を症例と合わせて論文報告した。市販の単離肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞を用い、マトリゲル上に播種し、種々の成長因子を添加した条件で、肺胞様のorganoid/spheroid形成実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界で初のBPD-PH小児移植肺の検討から、肺発生段階の途上で出生した児の肺の状態が明らかになったことにより、出生週数が年々早くなっている超低出生体重児の治療法について再考する契機となる。また、小児肺CTを用いたvolumetryはまだ一般的ではなかったが、本研究でvolumetryをindexとして算出したことにより、今後の肺発達段階の評価法の一つとなる可能性がある。さらに、本研究によって、未熟児慢性肺疾患に伴う肺高血圧症の治療法開発が進展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the pathogenesis of pulmonary hypertension associated with chronic lung disease in premature infants (BPD-PH). Immunostaining with alveolar epithelial cell markers and vascular endothelial cell markers was performed using BPD-PH patient lungs (transplant donor lungs), and the distribution in BPD-PH patient lungs was investigated. We analyzed the CT findings of a BPD-PH patient who had been treated with pulmonary vasodilators for 10 years, performed volumetry using analysis software, and reported the results in a paper together with the case. Using commercially available isolated alveolar epithelial cells and pulmonary fibroblasts, we seeded them on Matrigel and performed alveolar-like organoid/spheroid formation experiments under the conditions of adding various growth factors.

研究分野：小児呼吸器疾患・循環器疾患

キーワード：未熟児慢性肺疾患 肺高血圧症 肺胞上皮細胞 肺発生 肺volumetry

1. 研究開始当初の背景

肺実質の線維化を伴う疾患において、肺血管床の減少、肺血管抵抗の上昇、低酸素による低酸素性血管攣縮などにより肺高血圧 (PH)を呈する病態が知られている。気管支肺異形成症 (BPD) を呈する超低出生体重児の約 20%に PH を合併する (BPD-PH)。肺発生は Embryonic, Pseudoglandular, Canalicular, Saccular, Alveolar の 5 段階に分けられ、出生後も肺胞形成は年単位で継続しているとされるが、早産児は Alveolar period (肺胞形成期) 以前の Canalicular period や Saccular period に出生するため、この時期の高濃度/低濃度酸素曝露や気道感染によって、肺胞の恒常性が失われて正常の肺胞形成が妨げられ、重症例では BPD-PH を発症する。このような症例では、肺胞構成細胞である 1 型および 2 型肺胞上皮 (AT1/AT2) 細胞の傷害・修復機転とその破綻、alveolar-capillary barrier を形成する血管内皮細胞の傷害、および間葉系細胞の異常増殖が生じていると考えられる。当科で重症 BPD-PH から肺移植に至った症例の摘出肺の病理組織像では肺胞壁の菲薄化と気腫、それに隣接する肺胞の線維化、肺動脈の中膜肥厚と血管周囲の線維化の所見を呈していた (図 1)。このような BPD-PH 症例では呼吸不全と右心不全を合併し、PH を伴わない症例に比して生命予後が悪いが、その発症メカニズムは完全には解明されておらず、確立された治療法はない。

2. 研究の目的

本研究ではこのような BPD-PH の発症メカニズムを肺胞構成細胞レベルで解明し、薬物による治療介入の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小児患者肺における病理学的検討

これまでに東北大学病理学講座および小児病態学講座に保存してある、週数、月齢、重症度の異なる BPD-PH 患者肺組織を用い、それぞれの肺胞構成細胞特異的なマーカーを用いて免疫蛍光染色を行い、発現、局在、肺胞形態について検討する。また、PDGF、FGF、TGF- β 、VEGF など、肺胞発生に必須の因子である一方、線維化肺や PH 肺では過剰に発現して疾患の病態に関与している成長因子についても、発現量や局在を検討する。また、対照として、非肺疾患で死亡した小児肺の染色および先天性心疾患に伴う PH(CHD-PH)患者肺の染色も行う。また、成人の線維化肺+PH 症例の肺組織での肺胞構成細胞パターンとの比較も行う。マーカー発現の定量化には TissueFAXS ソフトウェアを使用する。

(2) 3D 培養システム (スフェロイドアッセイ)の構築と薬物スクリーニング

成体マウス肺 AT2 細胞と線維芽細胞によるスフェロイドアッセイシステムは既に多くの報告があるが、仔マウス肺を用いた BPD-PH モデルは構築されていない。本研究では肺胞形成期の肺胞上皮と内皮細胞を Fluorescence activated cell sorting (FACS)を用いて分離し、マトリゲル上で共培養して肺発生を模し、酸素投与 / 気道感染による BPD-PH モデルを構築する。このアッセイシステ

ムを用いて肺胞形成期の肺胞傷害とその修復機転について検討し、薬剤投与による効果を判定する。

(3) 肺血管拡張薬を使用した BPD-PH 症例の集積と画像所見・血清マーカー値の解析

これまでに 10 例の BPD-PH 症例について、胸部写真、CT、MRI、血清 KL-6 や SP-A/SP-D などの肺胞傷害マーカー、病歴や BPD の程度、心臓カテーテル所見やエコー所見データを集積している。これらを統計学的に解析し、BPD-PH の増悪因子と薬物治療、在宅酸素などの治療介入による効果について検討する。CT 所見の変化は morphometry / texture 解析を用いて定量化する。

4. 研究成果

(1) BPD-PH 肺の病理学的検討

実際の BPD-PH 患者肺（移植ドナー肺）を用いて、肺胞上皮細胞マーカー (proSP-C, E-cadherin)、血管内皮細胞マーカー (CD31, VE-cadherin) による免疫染色を行い、BPD-PH 患者肺における分布について検討した (American Thoracic Society 2019)。多施設で保管されている BPD-PH および BPD、先天性心疾患による PH 患者肺にアクセスし、分析を行った。

(2) 小児肺発達段階と Volumetry を用いた小児肺の検討

肺血管拡張薬を用いて治療してきた BPD-PH 患者の 10 年間の CT 所見を解析し、解析ソフトを用いて Volumetry を行い、その結果を症例と合わせて論文報告した。本患者は肺発生において Alveolar period (肺胞形成期) 以前の Saccular period に出生しており、病理学的には、肺胞形成前の所見である肺胞内腔の拡大や、感染など出生後の変化に伴う肺胞構造の破壊と線維化所見が認められた。また、肺の Volume は経時的に拡大するが、体表面積で除し index として計算すると、ほぼ一定の割合であることが判明した。一方、BPD により気腫が拡大するとこの index が高くなることも明らかになった (Pediatric Pulmonology, 56:3417–3421, 2021)。このデータをもとに、他の症例も蓄積し、volumetry を用いた肺発達について検討した。そして、The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology にて、BPD のセッションオーガナイザーを務め、JRS Young Scientist Award を受賞した。

(3) Organoid 培養システム

In vitro の実験として、市販されている単離肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞を用い、マトリゲル上に播種し、種々の成長因子を添加した条件で、肺胞様の organoid/spheroid 形成実験を行った。播種後数日間はスフェロイド形態が維持されるものの、その後維持されずに細胞増殖が起きてしまったため、成長因子添加のタイミング等を検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Chiharu Ota, Ryoko Saito, Junya Tominaga, Shinya Iwasawa, Takashi Hiram, Yasushi Matsuda, Katsunori Ono, Takehiko Onoki, Masato Kimura, Yoshinori Kawabata, Yoshinori Okada	4. 巻 56
2. 論文標題 Bilateral lung transplantation in a 9-year-old girl with bronchopulmonary dysplasia with pulmonary hypertension.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Pulmonology	6. 最初と最後の頁 3417-3421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ppul.25597	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takeru Oikawa, Chiharu Ota, Shinya Iwasawa, Takehiko Onoki, Hideyuki Ikeda, Takushi Hanita	4. 巻 6620353
2. 論文標題 Thoracic Empyema Secondary to Congenital Chylothorax in a 14-Month-Old Boy with Noonan Syndrome.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Rep Pediatr	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/6620353	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 De Santis MM, Alsafadi HN, Tas S, Boeluekbas DA, Prithiviraj S, Da Silva IAN, Mittendorfer M, Ota C, Stegmayer J, Daoud F, Koenigshoff M, Swaerd K, Wood JA, Tassieri M, Bourguin PE, Lindstedt S, Mohlin S, Wagner DE	4. 巻 33
2. 論文標題 Extracellular Matrix Reinforced Bioinks for 3D Bioprinting Human Tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Materials	6. 最初と最後の頁 2005476 ~ 2005476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adma.202005476	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hu Yan, Ng-Blichfeldt John-Poul, Ota Chiharu, Ciminieri Chiara, Ren Wenhua, Hiemstra Pieter S, Stolk Jan, Gosens Reinoud, Koenigshoff Melanie	4. 巻 38
2. 論文標題 Wnt/ -catenin signaling is critical for regenerative potential of distal lung epithelial progenitor cells in homeostasis and emphysema	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STEM CELLS	6. 最初と最後の頁 1467 ~ 1478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeru Oikawa, Chiharu Ota, Shinya Iwasawa, Takehiko Onoki, Hideyuki Ikeda, and Takushi Hanita	4. 巻 -
2. 論文標題 Thoracic Empyema Secondary to Congenital Chylothorax in a 14-Month-Old Boy with Noonan syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Casae report in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/6620353	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuka Rokugo, Chiharu Ota, Masato Kimura, Yoji Sasahara	4. 巻 12
2. 論文標題 Preoperative administration of propranolol reduced the surgical risks of PHACES syndrome in a 14-month-old girl	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMJ Case Reports	6. 最初と最後の頁 e228117 ~ e228117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bcr-2018-228117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takaya Suzuki, Chiharu Ota, Naoya Fujino, Yukiko Tando, Satoshi Suzuki, Mitsuhiro Yamada, Takashi Kondo, Yoshinori Okada, Hiroshi Kubo	4. 巻 9
2. 論文標題 Improving the viability of tissue resident stem cells using an organ preservation solution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 2093 ~ 2104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mao Hagino, Chiharu Ota, Takehiko Onoki, Shinya Iwasawa	4. 巻 15
2. 論文標題 Male infant with Noonan syndrome with RAF-1 gene mutation who survived hypertrophic cardiomyopathy-induced fatal heart failure and uncontrollable arrhythmias	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMJ Case Reports	6. 最初と最後の頁 e250342 ~ e250342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bcr-2022-250342	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takehiko Onoki, Takaya Metoki, Shinya Iwasawa, Kengo Kawano, Masato Kimura, Shigeo Kure, Chiharu Ota	4. 巻 61
2. 論文標題 Two Distinct Cases of Adult-onset Kawasaki Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3525 ~ 3529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.9044-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大田千晴, 岩澤伸哉, 大軒健彦, 木村正人, 六郷由佳, 建部俊介
2. 発表標題 当院小児科および循環器内科でフォロー中の異なる年齢層の成人期Eisenmenger症候群症例の検討
3. 学会等名 小児循環器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chiharu Ota, Masato Kimura, Yasushi Matsuda, Shinya Iwasawa, Ryoko Saito, Yoshinori Kawabata, Shigeo Kure, Yoshinori Okada
2. 発表標題 Bilateral lung transplantation (BLTx) in a 9-year-old girl with pulmonary hypertension associated with severe bronchopulmonary dysplasia (BPD)
3. 学会等名 American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiharu Ota, Ryoko Saito, Fumihiko Namba, Shannon J Simpson
2. 発表標題 Bronchopulmonary dysplasia in adult: the early origins of adult lung disease Bronchopulmonary dysplasia-from the pathologist's point of view
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 充啓 (Yamada Mitsuhiro) (00396483)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	埴田 卓志 (Hanita Takushi) (30400360)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	菊池 敦生 (Kikuchi Atsuo) (30447156)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	小山 涼子(齋藤涼子) (Koyama Ryoko) (30733349)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	大田 英揮 (Ota Hideki) (40586905)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	木村 正人 (Kimura Masato) (80646894)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------